

항산화능이 증대된 *Arthrospira platensis* 균주 개량 및 특성 분석

최수정, 이재화*

Characteristic of *Arthrospira platensis* Enhanced Antioxidant Activity

Soo-Jeong Choi and Jae-Hwa Lee*

Received: 13 June 2014 / Accepted: 19 June 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) is a microscopic and filamentous cyanobacterium that derives its name from the spiral or helical nature of its filaments. In this study, we induced mutants of *A. platensis* through NMU treatment and selected two strains by level of lipid contents. We named mutant '1-9', '2-5', and they were cultivated in the same way with the wild type. During 12 days cultivation, cell growth, dry cell weight, pigment content, and lipid content were measured for characteristics of mutants. As a result, pigment and lipid content of mutants were increased about 3.6, 1.8 times compared with wild type, respectively. It was shown that total flavonoid and polyphenol contents of mutants were increased about 1.5 times compared with wild type. And radical scavenging effect of mutants were increased about 10% compared with wild type.

Keywords: *Arthrospira platensis*, N-methy-N-nitrosourea, Lipid, C-phycoyanin, Antioxidant activity

1. INTRODUCTION

미세조류는 식물성 플랑크톤과 같은 광합성을 하는 마이크로미터 크기의 수중 단세포 생물로 약 10만 종 이상이 보고되어졌으며 육상식물에 비해 단위면적당 생산율이 높다고

알려져 있다 [1]. 미세조류 내 카로티노이드, 지방산, 항산화제 등의 유용물질은 주로 화학분야 및 바이오매스 생산에 이용된다. 햇빛이 풍부한 알칼리 호수에 자생하는 *Arthrospira platensis* (*A. platensis*)는 나선형의 남조류이다 [2]. *A. platensis*는 polyunsaturated fatty acid, β -carotene, chlorophyll-a, c-phycoyanin과 같은 유용성분을 함유하여 영양분으로써의 가치가 우수하다고 보고되어진다 [3,4]. C-phycoyanin은 *A. platensis*가 함유하는 단백질 중 약 20%를 차지하며 질소형태의 분자로 저장되어 체내에 활동하며 항산화, 지질 과산화, 간보호, 항염증 등의 효능을 가진다 [5]. Manpreet 등 [6]은 piroxicam과 c-phycoyanin을 이용하면 암을 유도하는 1,2-dimethylhydrazine (DMH)는 감소하며 COX-2와 같은 가능한 타겟임을 확인하였다.

A. platensis 내 지질은 식품과 의약품 그리고 재생 가능한 바이오매스로 활용이 가능하다. 미세조류의 중성지질 함량은 배양 조건에 따라 축적률이 달라진다고 보고되며 기존 작물에 비해 약 50~100 배 이상 높은 지질 생산량을 자랑한다 [7]. 미세조류는 다른 작물에 비해 높은 지질 함유량에도 불구하고 세포의 밀도가 상대적으로 낮고, 미생물에 의한 오염도가 높은 단점을 가져 산업적인 이용률은 낮다. 또한 미세조류 내 지질이나 지방산과 같은 유용물질을 추출하기에는 생산성이 낮아 경제적인 한계를 가진다. 이를 극복하기 위해 지질과 같은 유용물질이 다량 함유된 미세조류의 균주 개량을 통해 생산성을 높이는 것이 필요하다.

미세조류 내 지질과 같은 유용물질을 산업적으로 이용하기 위해 다양한 연구들이 진행되고 있다. 세포 내 유용물질의 함량 증가를 위해 돌연변이원 처리를 통한 균주개량 방법과 유전자 조작을 통한 균주개량 방법이 사용되고 있으며, 다양한 돌연변이원 처리를 통해 균주를 개량하는 무작위적 돌연변이법이 많이 사용되고 있다 [8]. 돌연변이원 종류로는

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5831, Fax: +82-51-999-5831
e-mail: jhalee@silla.ac.kr

크게 물리적 돌연변이원과 화학적 돌연변이원으로 나눌 수 있으며 물리적 돌연변이원은 자외선과 전자빔 그리고 X-선이 있으며 화학적 돌연변이원은 ethyl methane sulfate (EMS), N-nitroso-N-methylurea (NMU), sodium azide (NaN_3)를 대표적으로 들 수 있다. 화학적 돌연변이원은 변이체의 유기 효율이 높다고 보고되어지며, sodium azide는 염색체의 변형 및 염기의 삭제를 통해 돌연변이가 유발된다고 알려져있다 [9]. 예를 들어 EMS 처리를 통해 유도된 *A. platensis* 개량 균주는 야생균주에 비해 이산화탄소 고정능이 약 15~17% 가량 증가되었으며 세포의 부상성 또한 약 2 배 이상 증가되어 효과적인 수확을 가능하게 하였다 [10]. 또한 NMU와 quizalofop-p-ethyl을 이용하여 *Nannochloropsis oculata* 균주 개량을 진행하였을 때에 eicosapentaenoic acid (EPA)가 증대된 개량 균주를 획득하였으며, N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (MNNG)를 *Chlorella sorokiniana*에 처리하여 lutein 함량이 높은 개량 균주를 얻을 수 있었다 [11]. 이처럼 돌연변이원 처리를 통한 균주개량은 세포 내 대사산물 함량의 증대라는 장점을 가진다. NMU는 알킬레이트 물질에 해당되는 돌연변이원으로 유전자의 염기쌍 변화를 통해 돌연변이원을 유도한다. 따라서 NMU를 돌연변이원으로 이용한다면 보다 많은 형태의 개량 균주를 획득할 수 있을 것이라고 판단된다. 본 연구에서는 화학적 돌연변이원에 해당하는 NMU를 *A. platensis*에 처리하여 개량균주를 획득하였으며 항산화능과 같은 생리활성을 분석하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 사용균주 및 배양방법

본 연구는 *Arthrospira platensis* NIES 39 (KCTC AG30033)를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다. 알칼리성 무기배지인 SOT배지로 균주를 배양하였다. SOT 배지는 SOT-1과 -2를 각각 121°C에서 15 분 간 멸균 및 냉각시켜 혼합 후 10 N NaOH를 이용해 pH 9로 조절하였다. 균주는 35°C, 120 rpm, 광도 6,000 lux의 조건에서 배양하였다. 광주기는 12 시간 : 12 시간 (명 : 암)으로 명반응 시 형광등을 사용하였다 [12].

2.2 색소 함량 분석

광합성을 통해 성장하는 미세조류 내 색소함량의 변화를 알아보기 위해 배양 12일 차에 세포 내 클로로필과 카로티노이드 함량을 분석하였다. 세포 내 색소함량 측정은 세포 1 mL을 13,000 rpm에서 3 분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 methanol 1 mL을 첨가하여 60°C에서 30분간 반응하였다. 이후 0°C에서 2분간 냉각 후 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리한 상등액은 UV/Vis분광기를 이용해 650, 653, 461, 664 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 측정 후 아래 식에 대입하여 계산하였다 [13].

$$\text{Chlorophyll (mg/L)} = (A_{650} \times 25.5) + (A_{655} \times 4)$$

$$\text{Carotenoid (mg/L)} = (A_{461} + (0.046 \times A_{664})) \times 4$$

2.4. 지질함량 분석

NMU 조사 후 얻은 변이주의 지질 함량을 분석하기 위해 Chen 등 [14]의 방법을 이용하여 측정하였다. 측정 하려는 세포의 흡광도를 0.5로 조정하고 세포 10 μL 와 증류수 138 μL , 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 조절한 nile red 2 μL , DMSO 50 μL 를 혼합하여 40°C에서 10분간 반응하였다. 반응 후 형광광도계 (Infinite F 200 pro, Tecan, Austria)를 이용하여 excitation 495 nm, emission 620 nm에서 형광값 (fluorescence intensity)을 측정 후 nile red로 염색된 세포의 형광값과 미세조류 자체 형광값을 빼서 세포가 가진 지질 함량을 분석하였다. 측정한 지질 함량의 정량을 위해 Bertozzini 등 [15]의 방법을 변형하여 검량선을 작성하였으며 이를 바탕으로 세포 내 지질함량의 정량을 진행하였다 [16].

2.5. C-phycoyanin 함량 분석

동결 건조한 미세조류 100 mg을 0.5 M 인산완충용액 (pH 6.8) 5 mL에 넣고, homogenizer (Wheaton, USA)를 이용하여 세포를 분쇄하였다. 분쇄하여 얻은 조추출액을 4°C에서 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하여 c-phycoyanin 함량을 측정하였다. C-phycoyanin은 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 인산완충용액에 희석하였으며 이를 이용한 표준 검량선을 작성하여 사용하였다.

2.6. 세포 내 항산화능 분석

Homogenizer를 이용하여 얻은 시료를 이용하여 total flavonoid content, total polyphenol content, 자유라디칼 소거능 (DPPH)을 ELISA reader (Molecular Devices, Spectra MAX 250, USA)로 측정하였다.

2.6.1. Total flavonoid content

Total flavonoid content는 NFRI [17]의 방법을 준용하여 시험하였다. 각 시료 100 μL 에 diethylen glycol 1 mL과 1 N NaOH 100 μL 를 혼합하고 37°C에서 1시간 동안 정치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total flavonoid content는 naringin (Sigma)을 이용하여 작성한 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

2.6.2. Total polyphenol content

Total polyphenol content는 Folin-Denis [18] 방법에 의해 측정하였다. 시료 50 μL 에 2% Na_2CO_3 , 1 mL을 가하여 혼합, 3 분간 정치 후 1 N Folin-ciocalteu (Sigma, USA) 50 μL 를 첨가하였다. 혼합액을 30분간 반응 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total polyphenol content는 gallic acid (Sigma)를 이용하여 표준 검량선을 작성하였으며 검량선을 이용하여 계산하였다.

2.6.3. 자유라디칼 소거능

시료의 자유라디칼 소거능은 Blossis [19]의 방법을 변형하여 전자공여효과로 나타나는 시료에 대한 환원력을 측정하였다. 시료 100 µL에 0.1 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 50 µL와 10% 에탄올 100 µL를 가하여 실험을 진행하였다. 이 반응액을 혼합하고 실온에 15분간 방치하였다. 반응액은 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Scavenging effect(\%)} = [1 - ((A_{\text{sample}} - A_{\text{sampleblank}}) / A_{\text{control}})] \times 100$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 돌연변이 유도 및 세포 성장

대수증식기의 *A. platensis* 세포를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 수확하였다. 0.5 M 인산완충액을 이용하여 2회 세척 후 SOT 배지를 첨가하여 NMU를 1, 2 mM의 농도로 처리하여 암 배양 후 고체배지에 streak하여 단일 콜로니를 유도하였다. 유도된 단일 콜로니는 액체 배지로 옮겨 배양하였으며 일정 기간 배양 후 균주의 특성 분석을 위한 실험을 진행하였다.

NMU 1, 2 mM 처리를 통해 다수의 개량균주를 획득하였으며 획득한 개량균주 가운데 야생균주에 비해 지질 함유량이 높은 개량균주를 각각 1-9, 2-5로 명명하였다. 야생균주와의 세포 성장 비교를 위해 3일 간격으로 12일 동안 520 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig. 1(a)). 개량균주 1-9는 야생균주에 비해 약 6% 감소한 반면 2-5 균주는 약 10% 증가함을 확인하였다. 배양 12일 후, 세포 건조중량으로 나타낸 바이오매스 생물량의 경우 1-9 균주는 약 1.2 g/L, 2-5 균주는 1.4 g/L를 나타내어 야생균주의 바이오매스 생물량인 1.3 g/L와 비슷한 경향을 나타냄을 확인하였다 (Fig. 1(b)). 본 실험을 통해 미세조류의 흡광도에 비해 바이오매스 양이 낮음을 나타내는 것으로 *Nannochloropsis oculata* 에 자외선 조사로 유도된 변이주의 실험결과와 동일함을 나타낸다 [13]. *N. oculata* 변이주 역시 흡광도에 비해 바이오매스 양이 약 24% 낮음을 보고하였으며 본 실험에서도 26% 낮음을 확인할 수 있었다.

3.2. 지질 함량 변화

돌연변이원 처리를 통해 선별한 개량 균주 내 지질 함량 변화를 확인하기 위해 세포 배양 12일 차에 형광 강도 측정을 통해 지질 함량을 분석하였다. 실험에 사용한 형광 강도 측정법은 중성 지질 표준 물질인 triolein 정량을 위해 표준 곡선을 이용하여 시료의 형광강도와 지질 함량을 연관시켜 나타내는 방법이다. Triolein과 형광 강도 사이에 좋은 직선성 ($R^2=0.99935$)을 나타내어 지질 정량에 사용하였다. 개량균주 1-9, 2-5의 형광 강도 수치를 검량선을 이용하여 정량한 결과, 19.4 µg/mL, 15.7 µg/mL로 10.6 µg/mL의 야생균주 지질 함량

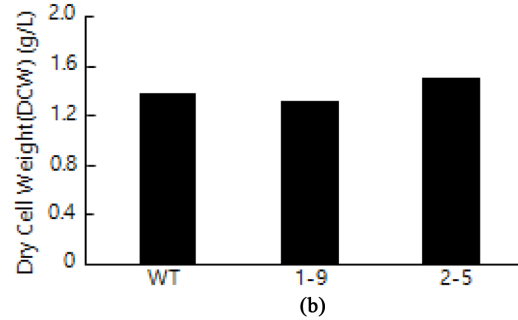
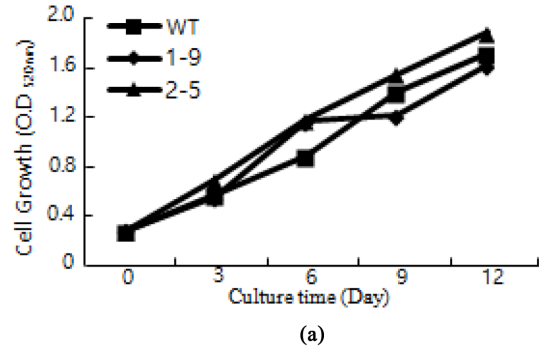


Fig. 1. Cell growth and dry cell weight of WT, 1-9 and 2-5. (a) Cell growth, (b) Dry cell weight.

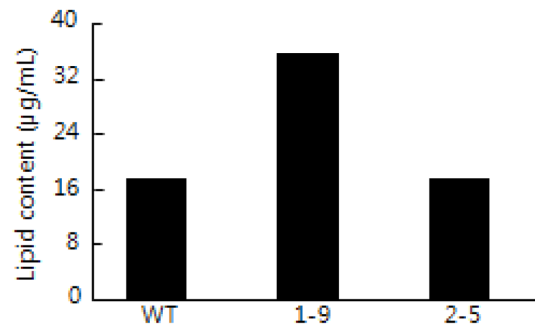


Fig. 2. Lipid content of WT, 1-9 and 2-5.

보다 약 1.8배, 1.5배 증가함을 확인하였다 (Fig. 2).

미세조류는 질소, 탄소원 등의 영양분이 고갈되거나 온도와 pH 같은 조건의 변화를 통한 성장환경 변화는 세포 내 지질 대사 변화를 통해 다량의 지질을 함유하는 것으로 알려져 있다. 오 등 [20]은 fed-batch 실험 방법을 이용하여 *Chlorella* 를 배양하는 실험을 진행하였으며 그 결과, 지속적으로 배지 내 영양분이 공급된 시기에는 균체의 농도가 증가함을 확인하였지만 영양분이 결핍된 배양 말기에는 중성 지질과 같은 세포 내 유용물질의 함유량이 증가함을 확인할 수 있었다. Boussiba [21]은 질소 결핍 성장환경에서 *Haematococcus pluvialis*의 특성을 분석하였으며, 질소 결핍 환경에서 세포 내 astaxanthin의 함유량이 증가함을 보고하였다. 미세조류는 성장 시 영양분 결핍과 같은 스트레스에 노출되면 불리한 조건

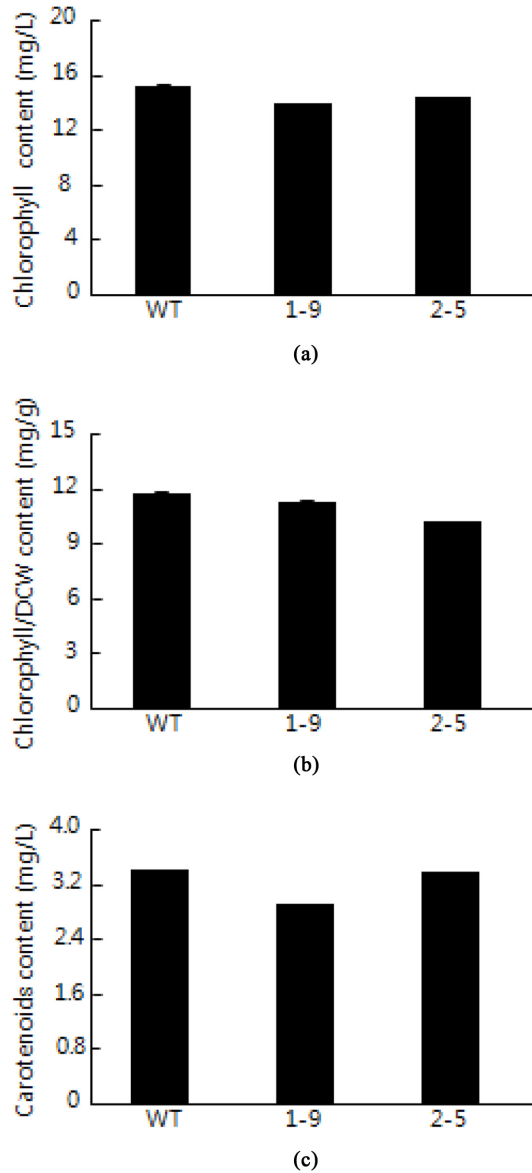


Fig. 3. Chlorophyll, chlorophyll per dry cell weight and carotenoid content of WT, 1-9 and 2-5. (a) Chlorophyll content, (b) Chlorophyll content per dry cell weight, (c) Carotenoid content.

에 대처하기 위해 지질과 같은 유용물질의 합성 대사과정을 변환하게 된다. 이러한 유용물질 합성 대사과정 변환은 세포 성장을 방해하는 요인으로 작용한다. 하지만 본 실험을 통해 선별한 두 개량 균주는 야생균주와 비슷한 세포 성장률을 보였지만 중성지질 함유량은 약 1.5배 이상 증가한 것을 확인하였다.

3.3. 색소 함량 변화

개량균주 세포 내 색소함량 변화를 확인하기 위해 배양 12일 차에 클로로필과 카로티노이드 함량을 측정하였다. 개량균주 1-9, 2-5의 클로로필 함량은 각각 13.8 g/L, 14.2 g/L로 야

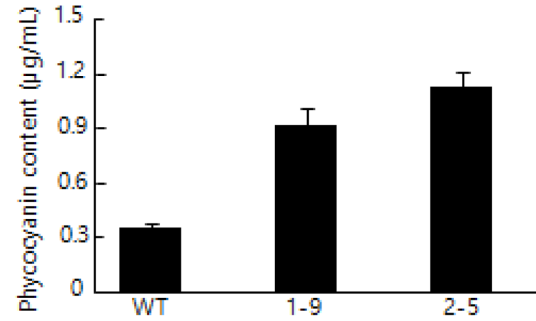


Fig. 4. C-phycoerythrin content of WT, 1-9 and 2-5.

생균주에 비해 약 9%, 6% 감소하였다 (Fig. 3(a)). 이를 세포 건조중량 당 클로로필 함량으로 나타내면 11.2 mg/g, 10.2 mg/g으로 야생균주에 비해 약 4%, 13% 감소함을 확인하였다 (Fig. 3(b)). 카로티노이드 함량은 15%, 1% 감소하여 야생균주와 비슷하거나 일부 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 3(c)).

A. platensis 내 유용물질 중 하나인 c-phycoerythrin 함량을 측정 및 분석하였다. C-phycoerythrin은 *A. platensis* 내 항산화, 항염증과 같은 생리활성에 영향을 미치는 물질로, 본 실험에서는 야생균주 및 개량균주 내 물질 함유량을 확인하기 위해 인산완충용액을 이용하여 추출 후 함량을 분석하였다. C-phycoerythrin을 이용한 표준 검량선 작성을 위해 농도별로 흡광도를 측정하였으며 좋은 직선성 ($R^2=0.9925$)를 나타내어 c-phycoerythrin 정량에 적합하다고 판단하였다. 야생균주 내 c-phycoerythrin 함량은 약 0.3 µg/mL인데 반해 1-9는 약 0.9 µg/mL, 2-5는 약 1.1 µg/mL의 c-phycoerythrin 함유량을 나타내어 약 2.6배, 3.2배 증가함을 확인하였다 (Fig. 4).

Sharma 등 [22]은 식물세포에 돌연변이원을 처리하여 대사 경로의 변화를 확인하였다. 광합성을 통해 성장하는 식물세포에 물리적 돌연변이원인 자외선을 처리하였으며 이를 통해 식물세포 내 색소 함량 및 개체 수 감소를 확인하였다. S. L. Dube 등 [23]의 결과를 통해서도 돌연변이원 처리를 통한 식물세포 내 색소함량의 변화를 확인할 수 있었다. S. L. Dube 등은 자외선과 같은 돌연변이원 처리는 식물의 유용물질 생산과 같은 광합성 대사를 저해하며, 돌연변이원으로 인해 스트레스가 유도되면 CO_2 저감 효과 및 세포 내 색소 함량의 감소를 보고 하였다. 또한 미세조류 세포 내 지질 함량 변화는 색소 함량 변화와 평행적으로 발생하며 [24], phycoerythrin과 같은 색소함량 감소는 지방산과 같은 유용물질의 함량 감소가 함께 발생함을 보고하였다 [25]. 미세조류는 질소원 결핍 및 고광도의 빛 조사를 통한 스트레스 환경에서 성장을 위해 지질과 carotenoid와 같은 유용물질을 다량 축적한다 [26]. 스트레스 환경에서 성장하는 세포 내 지질은 세포질의 oli body에 위치하여 색소 (chlorophyll, carotenoid) 등의 축적을 가능하게 하며, oli body 내 색소는 지질 과산화 억제와 같은 항산화 효과를 나타낸다. 이와 같이 세포 내 지질은 색소의 성분과 깊은 관련이 있음을 나타낸다 [27].

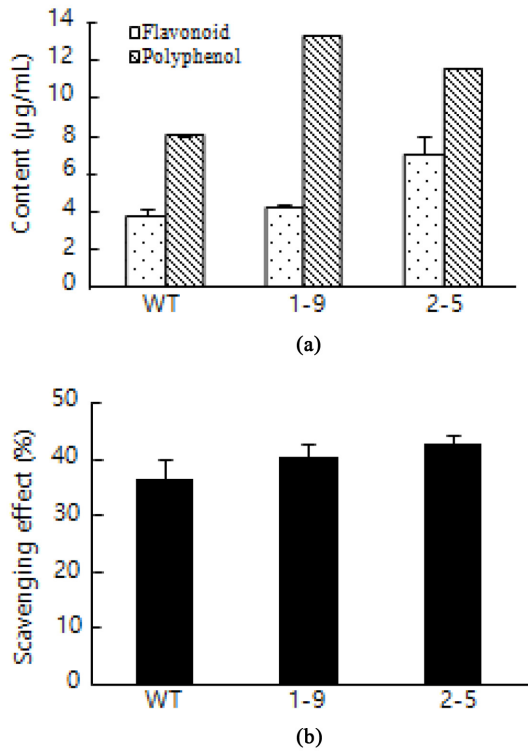


Fig. 5. Antioxidant compound content and radical scavenging effect of WT, 1-9 and 2-5. (a) Total flavonoid and polyphenol content, (b) Radical scavenging effect.

3.4. 개량균주 항산화능 분석

개량균주 내 항산화 물질 함량 및 항산화능을 비교하였다. 미세조류의 유용성분에 해당하는 지질과 엽록소, 카로티노이드 같은 색소의 함량이 야생균주와 차이가 있음을 확인하였다. 또한 개량균주 내 c-phycoyanin 함량의 변화를 통해 항산화능과 같은 생리활성의 변화를 유추하게 되었다. 따라서 플라보노이드 및 폴리페놀과 같은 항산화물질 함량 및 자유라디칼 소거능을 측정하였다. 개량균주의 플라보노이드, 폴리페놀 및 자유라디칼 소거능 측정을 위해 20 mg/mL 농도로 인산완충용액을 이용하여 추출하였다. 인산완충용액을 이용해 추출한 시료의 항산화 물질 함량은 Fig. 5에 나타내었다. 플라보노이드 정량을 위해 naringin을 이용하여 표준검량선을 작성하였으며 좋은 직선성 ($R^2=0.994$)을 나타내어 플라보노이드 정량에 적합하다고 판단된다. 개량균주 1-9, 2-5의 플라보노이드 함량은 4.1 µg/mL과 6.8 µg/mL로 야생균주에 비해 약 1.1배, 1.8배 증가함을 확인하였다. 폴리페놀 정량을 위해 gallic acid를 이용하여 표준검량선을 작성하였으며 좋은 직선성 ($R^2=0.9862$)을 나타내어 폴리페놀 정량에 적합하다고 판단된다. 개량균주 1-9, 2-5의 플라보노이드 함량은 12.9 µg/mL과 11.3 µg/mL로 야생균주에 비해 약 1.6배, 1.4배 증가함을 확인하였다. 자유라디칼 소거능 측정 결과 야생균주는 약 36%였는데 반해 개량균주 1-9, 2-5 균주는 약 40%, 42%의 소거능을 나타냄을 확인하였다 (Fig. 5(b)).

다수의 논문들은 개량된 미세조류의 균주 내 항산화 물질 함량이 야생균주에 비해 높음을 보고하였다. 김 등은 전자빔 조사를 통해 변이주를 획득하였으며 변이주의 항산화물질 함량 및 항산화능을 비교 분석하였으며, 전자빔 조사를 통해 획득한 변이주의 플라보노이드 함량은 야생균주에 비해 약 1.9배 증대되었으며, 폴리페놀 함량 또한 약 1.8배 증대되었다 [28]. Abd-El-Baky 등 [29]은 미세조류의 성장 환경 및 돌연변이원 처리와 같은 스트레스 상황에서 세포 내 항산화 물질 축적량 등이 높아진다고 보고하였으며 이는 세포 내 유용물질 함량 변화와 유사하다고 보고하였다. 이러한 보고들을 바탕으로 본 연구에서의 NMU 처리는 스트레스 요인으로 작용하여 미세조류 세포 내 항산화 물질 함량 대사에 변화를 주었을 것이라고 추측할 수 있다.

4. CONCLUSION

본 연구는 미세조류인 *A. platensis*에 1, 2 mM의 NMU 처리를 통해 돌연변이를 유도하였고, 지질 함유량이 증대된 변이주 1-9, 2-5를 선별하였다. 1-9와 2-5의 생장속도와 세포 건조 중량 및 색소(클로로필, 카로티노이드) 함량은 야생균주와 비슷하거나 조금 증가함을 보였다. 하지만 미세조류 유용물질에 해당하는 돌연변이주의 지질과 c-phycoyanin 함량은 야생균주에 비해 눈에 띄는 차이를 보였다. 지질 함량은 Nile red를 이용하여 세포 염색 후 형광강도를 측정하고, triolein을 이용하여 정량하여 나타내었으며 돌연변이주의 지질 함량은 야생균주에 비해 최대 1.8 배 증대되었음을 확인하였다. C-phycoyanin 함량 분석을 위해 야생균주와 돌연변이주를 0.5 M 인산완충용액으로 추출하였으며, 측정 결과 야생균주에 비해 돌연변이주의 c-phycoyanin 함량은 약 3.6 배 증가함을 확인할 수 있었다. C-phycoyanin 함량 증대는 항산화능에 영향을 미친다는 기존의 보고를 참고하여 항산화 물질인 flavonoid와 polyphenol 함량 및 자유라디칼 소거능 실험을 진행하였다. 돌연변이주의 항산화 물질 함량은 야생균주에 비해 약 1.5배 이상 증가를 확인하였으며, 자유라디칼 소거능은 야생균주와 비슷함을 확인하였다. 화학적 돌연변이원 처리를 통해 선별된 1-9, 2-5균주는 세포 생장에 영향을 미치지 않으며 유용물질인 중성지질 및 c-phycoyanin 함량을 증대시키며 항산화 물질과 항산화능 또한 증가하여 기능성 식품 산업에 적용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Widjaja, A., C. C. Chien, and Y. H. Ju (2009) Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 40: 13-20.
2. Choi, S. P. and S. J. Sim (2012) Microalgal bioconversion to organic resources from CO₂. *KIC News* 15: 11-24.

3. Belay, A. (2005) The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *JANA* 5: 27-48.
4. Joo, D. S. and S. Y. Cho (1999) The utility of microalgae and the biological activity materials in seawater microalgae. *J. East Coastal Research* 9: 89-108.
5. Datla, Praneel. "The wonder molecule called phycocyanin." Chennai-India: Parry Nutraceuticals. [Disponibile en linea: http://www.valensa.com/images3/Phycocyanin_The%20Wonder%20Molecule.pdf, en noviembre 2013] (2011).
6. Manpreet, K. S., V. Kim, and S. N. Sankar (2012) Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and c-phycocyanin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 361: 217-218.
7. Karkos, P. D., Leong, S. C., Karkos, C. D., Sivaji, N., and Assimakopoulos, D. A. (2011) *Spirulina* in clinical practice: Evidence-based human applications. *Evid based Complement Alternat Med*. 2011: 530153.
8. Choi, S. J., Y. H. Kim, A. Kim, and J. H. Lee (2013) *Arthrospira platensis* mutants containing high lipid content by electron beam irradiation and analysis of its fatty acid composition. *Appl. Chem. Eng.* 24: 628-632.
9. Sung, K. D., J. H. Ann, J. Y. Lee, S. J. Oh, and H. Y. Lee (1995) Kinetics of Cultivating Photosynthetic Microalga, *Spirulina platensis* in an Outdoor Photobioreactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 10: 401-405.
10. Yoo, C., C. J. Kim, G. G. Choi, C. Y. Ahn, J. S. Choi, and H. M. Oh (2009) A Mutant *Arthrospira platensis* M20CJK3 Showing Enhanced Growth Rate and Flootation Activity. *Microbiol. Soc. Kor.* 45: 268-274.
11. Cordero, B. F., I. Obratsova, I. Couso, R. Leon, M. A. Vargas, and H. Rodriguez (2011) Enhancement of Lutein Production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by Improvement of Culture Conditions and Random Mutagenesis. *Mar. Drugs* 9: 1607-1624.
12. Kim, J. Y., H. Joo, and J. H. Lee (2011) Carbon Dioxide Fixation and Light Source Effects of *Spirulina platensis* NIES 39 for LED Photobioreactor Design. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* 22: 301-307.
13. Kim, J. H., H. J. Park, Y. H. Kim, H. Joo, S. H. Lee, and J. H. Lee (2013) UV-induced mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the increase of lipid accumulation and its characterization. *Appl. Chem. Eng.* 24: 155-160.
14. Chen, W., M. Sommerfeld, and Q. Hu (2011) Microwave Assisted Nile Red Method for In vivo Quantification of Neutral Lipids in Microalgae. *Biores. Technol.* 102: 135-141.
15. Bertozzini, E., L. Galluzzi, A. Penna, and M. Magnani (2011) Application of the Standard Addition Method for the Absolute Quantification of Neutral Lipid in microalgae using Nile Red. *J. Microbiol. Methods* 87: 17.
16. Choi, S. J., Y. H. Kim, A. Kim, and J. H. Lee (2013) Isolation of an *Arthrospira platensis* Mutant Containing High Lipid Content by Electron Beam Irradiation and Analysis of its Fatty Acid Composition. *Appl. Chem. Eng.* 24.
17. NFRI (1990) Manuals of Quality Characteristic Analysis for Food Quality Evaluation (2). *National Food Research Institute*. Skuba, Japan, 61.
18. Folin, O. and W. Denis (1912) On Phosphotungstic-phosphomolybdic Compounds as Color Reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-249.
19. Zhu, N., M. Wang, G. J. Wei, J. J. Lin, C. S. Yang, and C. T. Ho (2001) Identification of Reaction Products of (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechin Gallate and Pyrogallol with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Food Chem.* 73: 2345-2349.
20. Oh, S. H., J. G. Han, N. Y. Kim, J. S. Cho, T. B. Yim, S. Y. Lee, and H. Y. Lee (2009) Cell Growth and Lipid Production from Fed-batch Cultivation of *Chlorella minutissima* according to Culture Conditions. *J. KSBB* 24: 377-382.
21. Boussiba, S., B. Wang, P. P. Yuan, A. Zarka, and F. Chen (1999) Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.* 21: 601-604.
22. Sharma, R. (2001) Impact of solar UV-B on tropical ecosystems and agriculture. Case study: Effect of UV-B on rice. *Proc. SEAW-PIPT98 & SAEWPIT2000*, 1: 92-101.
23. Dube, S. L. and W. Vidaver (1992) Photosynthetic competence of plantlets grown in vitro. An automated system for measurement of photosynthesis in vitro. *Physiol. Plant.* 84: 409-416.
24. Huang, S. J. and Mau, J. L. (2006) Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. *Food Sci. Technol.* 39: 707-716.
25. Singleton, V. L. and J. A. Rossi (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents *Am. J. Enol. Vit.* 16: 144-153.
26. Merzlyak, M. N., O. B. Chivkunova, O. A. Gorelova, I. V. Reshetnikova, and A. E. Solovchenko (2007) Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments and arachidonic acid content of the unicellular green alga *parietochloris incisa* (Trevouxioophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 43: 833-843.
27. Liu, Z. Y., G. C. Wang, and B. C. Zhou (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 99: 4717-4722.
28. Kim, Y. H., S. J. Choi, H. J. Park, and J. H. Lee (2014) Electron beam-induced mutants of microalgae *Arthrospira platensis* increased antioxidant activity. *J. JIEC* 20: 1834-1840.
29. Abd El-Daky, H. H., M. M. Hussein, and G. S. El-Baroty (2008) Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. *Afr. J. Biochem. Res.* 2: 151-164.